



REC'D 03 JAN 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 OCT. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



• 26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous Informer : INPI DIRECT

☎ N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE 20 OCT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0312229 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 20 OCT. 2003 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240962 D21710 NT			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) ANTICORPS PRESENTANT UN TAUX DE FUCOSE ET DE GALACTOSE OPTIMISE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale _____ Prénoms _____ Forme juridique _____ N° SIREN _____ Code APE-NAF _____		LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC 180036147 Zone d'activité de Courtaboeuf 3, avenue des Tropiques 91940 LES ULIS FRANCE	
Domicile ou siège		Rue _____ Code postal et ville _____ Pays _____	
Nationalité _____ N° de téléphone (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____		FRANCE Française N° de télécopie (facultatif) _____	
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

20 OCT 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0312229

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

20, rue de Chazelles

Code postal et ville

75847 PARIS CEDEX 17

Pays

N° de téléphone (facultatif)

01 44 29 35 00

N° de télécopie (facultatif)

01 44 29 35 99

Adresse électronique (facultatif)

info@regimbeau.fr

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

7 INVENTEUR (S)

Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes

☐ Oui

☒ Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒
☐

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Paiement échelonné de la redevance
(en deux versements)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
☐ Oui
☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)
☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG

**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

Le support électronique de données est joint

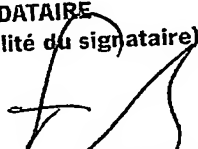
☐ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

La déclaration de conformité de la liste de
séquences sur support papier avec le
support électronique de données est jointe

☐
☐

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**



92-1001

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

M. ROCHET

5 La présente invention concerne des anticorps monoclonaux ayant une forte activité ADCC caractérisés en ce qu'ils possèdent, sur leur site de glycosylation du fragment Fc, des structures glycaniques présentant un rapport (taux de fucose / taux de galactose) inférieur ou égal à 0,6. L'invention porte également sur des compositions pharmaceutiques comprenant lesdits anticorps monoclonaux ayant une forte activité
10 effectrice.

L'immunothérapie passive, très répandue, est au cœur des pratiques du demandeur. Elle est fondée sur l'administration d'anticorps, en particulier des immunoglobulines de type IgG, dirigés par exemple contre une cellule ou une substance donnée.
15 L'immunothérapie passive au moyen d'anticorps monoclonaux a donné des résultats encourageants. Toutefois, si l'utilisation d'anticorps monoclonaux possède plusieurs avantages, comme des prix de revient raisonnables et une assurance de sécurité du produit quant à l'absence de contamination, il peut en revanche s'avérer difficile d'obtenir un anticorps monoclonal efficace.

20 Les immunoglobulines de type G (IgG), sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une partie variable spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une partie constante, médiatrice des propriétés effectrices de l'anticorps.
25

L'association des parties variables et du domaine CH₁ et CL des chaînes lourdes et légères forme les fragments Fab, qui sont connectés à la région Fc (partie constante de la chaîne lourde) par une région d'une exceptionnelle flexibilité (région charnière)

permettant ainsi à chaque Fab de se fixer à sa cible antigénique tandis que le domaine Fc reste accessible aux molécules effectrices (tels les Fcγ récepteurs et le C1q).

5 La région Fc est constituée de 2 domaines globulaires nommés Cγ2 et Cγ3. Les 2 chaînes lourdes interagissent étroitement au niveau des domaines Cγ3 tandis qu'au niveau des domaines Cγ2, la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un oligosaccharide lié à l'Asn 297 contribue à un écartement des 2 domaines.

10 Une étude a abordé la question de l'effet de la présence ou non de résidus de galactose et d'acide sialique dans l'oligosaccharide lié à l'Asn 297 (Wright et Morisson, 1998). Plus récemment, il a été indiqué que l'attachement d'un résidu de GlcNac en position bissectrice conduit à améliorer l'activité ADCC des IgG (Umana et *al.*, 1999 ; Davies, 2001).

15 Dans notre demande de brevet WO 01/77181, nous avons démontré que la glycosylation du Fc est essentielle pour l'activité biologique des IgG, particulièrement pour la lyse cellulaire médiée par le complément (CDC) et la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Nous montrons qu'une structure de type
20 biantennée, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, une faible fucosylation, des mannoses terminaux et/ou GlcNac terminaux non intercalaires est le dénominateur commun des structures glycaniques conférant une forte activité ADCC aux anticorps monoclonaux. Par la suite, notre découverte a été corroborée par les études de Shields et *al.*, 2002 et Shinkawa et *al.*, 2003.

25 Dans le cadre de la présente invention, nous avons observé que des anticorps polyclonaux anti-D thérapeutiques (NATEAD, WinRho), présentent une activité ADCC surprenante compte tenu de leur forte teneur en fucose.

Cette observation a renforcé notre conviction selon laquelle l'absence de fucose n'est pas en soi le seul facteur qui influence la capacité des anticorps à activer les récepteurs FcγRIII.

- 5 Nous avons étudié le profil glycosidique complet des anticorps polyclonaux afin de déterminer ce qui pouvait expliquer le fait que certains anticorps fortement fucosylés présentaient une forte activité ADCC ainsi qu'une forte activité activatrice de cellules porteuses de récepteurs FcγR.
- 10 Nous avons trouvé une corrélation inverse entre le rapport taux de fucose / taux de galactose et l'activité effectrice des anticorps. En effet, si l'anticorps est fortement fucosylé, il faut qu'il soit fortement galactosylé pour avoir une activité effectrice optimale. A contrario, si l'anticorps est faiblement fucosylé, il faut qu'il soit faiblement galactosylé pour avoir une activité effectrice optimale.
- 15 A la lumière de ces résultats expérimentaux, nous avons donc mis en place un procédé de préparation d'anticorps présentant un ratio taux de fucose / taux de galactose optimisé, ce qui permet l'obtention d'anticorps ayant une forte activité effectrice. En d'autres termes, nous proposons de nouveaux anticorps monoclonaux présentant une
- 20 structure oligosaccharidique complète et précise conférant une forte activité effectrice. A l'inverse, nous proposons également des anticorps dont la structure glycanique ne permet pas l'activation de l'activité cytotoxique.

Description

25

Ainsi, dans un premier aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain ayant une forte activité effectrice, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,
- b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation du fragment Fc desdits anticorps,
- c) sélection des anticorps dont le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur ou égal à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4.

L'étape a) peut consister par exemple en une purification des anticorps produits dans des clones provenant de lignées cellulaires, transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps. Par cellule, on entend des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures.

Ces cellules peuvent être modifiées génétiquement par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s) de sorte à obtenir des anticorps présentant le ratio taux de fucose / taux de galactose mentionné ci-dessus. A ce titre, l'invention porte sur un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal ayant une forte activité effectrice au moyen de cellules modifiées génétiquement par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s), notamment une galactosyl-transférase, caractérisé en ce que les structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc de l'anticorps présente un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6, de préférence inférieur à 0,5 ou 0,4. Alternativement, on peut purifier des anticorps obtenus de diverses sources et ajouter dans un mélange réactionnel une ou plusieurs glycosyl transférase(s), notamment une galactosyl-transférase, incubé pendant un temps déterminé jusqu'à l'obtention des anticorps présentant la structure glycanique décrite plus haut.

Par site de glycosylation du fragment Fc des anticorps on entend généralement Asn 297, mais l'invention vise également les anticorps dont la séquence en acide aminé a été modifiée.

5

Avantageusement, si le rapport mesuré entre le taux de fucose et le taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc desdits anticorps est supérieur à 0,6 il est possible de dé-fucosyler l'anticorps ou d'ajouter des résidus de galactose à l'anticorps, de manière à ce que ledit rapport devienne inférieur à 0,6 mais préférentiellement inférieur à 0,5 et même à 0,4 afin d'augmenter son activité fonctionnelle. Cette dé-fucosylation peut être effectuée in vivo en modifiant l'organisme ou la cellule source de sorte à bloquer complètement ou partiellement l'activité de la fucosyl-transférase ou in vitro directement sur l'anticorps par tout moyen approprié y compris l'addition d'une fucosidase dans une solution contenant l'anticorps.

15

Selon un mode de réalisation de l'invention, les clones proviennent de lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour une immunoglobuline humaine de type IgG, lesdites lignées pouvant être sélectionnées notamment parmi les lignées de myélome de rat, notamment YB2/0; CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr; Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

20

De manière avantageuse, le procédé permet de préparer des anticorps anti-facteur Rhésus (anti-D), anti-CD, anti-tumeurs, anti-virus, cette liste n'étant pas limitative.

25

Un autre objet de l'invention consiste en des anticorps monoclonaux thérapeutiques susceptibles d'être obtenus à partir du procédé précédent, lesdits anticorps présentant

une activité ADCC renforcée, à titre d'exemple des anti-D monoclonaux présentant une activité ADCC égale ou supérieure à celle des anticorps polyclonaux. Cette activité ADCC renforcée est tout au moins égale ou supérieure à celle de l'anticorps thérapeutique polyclonal ou monoclonal exprimé dans une lignée CHO DG44 ou DxB11.

Avantageusement, ces anticorps sont des immunoglobulines de type IgG, par exemple des IgG1 ou des IgG3. Préférentiellement, ces anticorps sont des IgG humaines ou comportent un Fc humain.

De manière avantageuse, ces anticorps monoclonaux thérapeutiques possèdent, sur leur site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc, des structures glycaniques possédant un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4.

L'invention vise également des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains produits par génie génétique, caractérisés en ce qu'ils possèdent, sur leur site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc, des structures glycaniques ayant un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6 préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4. La modification ou l'optimisation des structures oligosaccharidiques peut se faire in vivo directement dans les cellules ou systèmes biologiques génétiquement modifiés ou in vitro dans un mélange réactionnel en présence des enzymes mentionnées ci-dessus.

Avantageusement, ces anticorps sont des IgG chimériques, humanisées ou humaines ou des IgG ayant un fragment Fc humain.

Ainsi, un objet préféré de l'invention concerne une composition pharmaceutique d'anticorps monoclonaux tels que décrits ci-dessus.

La composition pharmaceutique peut comprendre par exemple un anticorps monoclonal modifié après production par modification enzymatique ou modifié par ajustement des conditions de culture (milieu de culture, oxygénation, température...) de telle manière que le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc desdits anticorps ait un rapport entre le taux de fucose et le taux de galactose au moins inférieur à 0,6 mais préférentiellement inférieur à 0,5 et même 0.4. La composition peut être formulée pour une administration par injection par exemple intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée. Cette solution peut comprendre un cation divalent, notamment du Zinc. Par exemple, la composition comprend une concentration en ion Zinc au moins égale à la concentration en anticorps.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention se rapporte à une composition pharmaceutique comprenant au moins 50%, 60%, 70%, 80% ou encore 90%, 95% ou 99% d'anticorps monoclonaux dans lesquels les structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc desdits anticorps ont un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6 préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore 0,4.

L'anticorps peut être dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un antigène Rhésus du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.

L'invention porte également sur l'utilisation desdits anticorps pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes, notamment pour le traitement des maladies échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sézary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux

biphényles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.

- 5 Ces traitements sont particulièrement adaptés au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.
- 10 L'invention porte également sur l'utilisation desdits anticorps pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives, les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies myéloïdes chroniques.
- 15 A titre d'exemple, l'anticorps peut être un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

- On pourra également utiliser lesdits anticorps pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, $IFN\gamma$, IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le
- 20 traitement du cancer et des infections.

- Dans un aspect complémentaire, l'invention vise des anticorps ayant une faible activité ADCC, et les compositions les comprenant, caractérisés en ce que leur site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc présente un rapport taux de fucose / taux de galactose supérieur à 1,2. Ces anticorps sont utiles pour préparer des médicaments pour
- 25 traiter et/ou prévenir les maladies auto-immunes, les allo-immunisations, le rejet de greffe, les allergies, l'asthme, les dermatites, les urticaires, les érythèmes, les maladies hémolytiques du nouveau né, et les maladies inflammatoires.

Les expérimentations présentées ci-après montrent la modulation de « l'effet fucose » par le galactose.

5 **EXEMPLE 1. Corrélation entre l'activité ADCC et le rapport taux de fucose sur taux de galactose d'une cohorte d'anticorps anti-D.**

Nous avons procédé à la mesure du taux de fucose, puis du taux de galactose de divers anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Nous en avons déduit le rapport entre les
10 deux, et mesuré l'activité ADCC relative à chaque anticorps.

L'anticorps F60 est issu d'un donneur humain Rhésus D négatif, immunisé avec des globules rouges portant l'antigène Rhésus D. Les lymphocytes B de ce donneur vont subir une transformation par EBV, et vont être sélectionnés les lymphocytes B
15 immortalisés producteurs d'anticorps anti-Rh(D). L'un des clones sélectionnés va être fusionner avec un hétéromyélome homme/souris. De cette fusion va être sélectionner le clone F60 qui permet d'obtenir la séquence codante de l'immunoglobuline G, puis un vecteur d'expression de l'immunoglobuline G, que l'on va transfecter, pour la suite des expériences, dans CHO ou YB2/0.

20 Les anticorps R290, R297 et R298 sont des anticorps produits dans YB2/0, transfectée avec un même vecteur.

De même, les anticorps T125-CHO DG44, T125-CHO K1, T125-CHO Lec13 sont des anticorps produits dans différentes lignées CHO, transfectées avec un même vecteur.

25 Les résultats apparaissent dans le tableau 1.

TABLEAU I

Nom Anticorps	Taux de Fucose	Taux de Galactose	Fucose/ Galactose	ADCC
R290	42,26	76,5	0,552	121
F60	38,1	98,1	0,388	127
R297	25,55	73,1	0,350	142.8
R298 (114)	53,06	43,2	1,228	104
R298 (112)	82,1	59,5	1,380	35.7
Anti-D WinRho*	76,1	156	0,488	100
T125-CHODG44	100	88,81	1,126	0
T125-CHO K1	95,74	73,79	1,297	0
T125 CHO Lec13	24,29	58,4	0,416	100

Une nette corrélation apparaît entre le rapport taux de fucose sur taux de galactose et l'activité ADCC. Cette corrélation est également présentée à la figure 1.

Références

- Davies J, Jiang L, Pan LY, Labarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 74, 288-294.
- Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weiler SHA, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26733-26740.
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. Absence of fucose but not presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. (2003) *J Biol Chem.* 278, 3466-3473.
- Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17, 176-180.
- Wright A, Morrison SL. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function :Studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. (1998) *J.Immunol.* 160, 3393-3402.

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain ayant une forte activité effectrice, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,
 - 10 b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation du fragment Fc desdits anticorps,
 - c) sélection des anticorps dont le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur ou égal à 0,6.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape a) consiste en une purification des anticorps produits dans des clones provenant de lignées cellulaires, transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps, lesdites cellules étant des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures.
- 20 3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2 pour la préparation d'un anticorps monoclonal ayant une forte activité fonctionnelle de type ADCC, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 25 a) purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différents clones provenant de lignées cellulaires transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps,
 - b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc desdits anticorps,

- c) sélection des anticorps dont le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur à ou égal 0,6.
4. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur à 0,5.
5. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le rapport entre le taux de fucose et le taux de galactose est inférieur ou égal à 0,4.
- 10 6. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal ayant une forte activité effectrice au moyen de cellules modifiées génétiquement par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s) caractérisé en ce que les structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc de l'anticorps présente un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6, de
- 15 préférence inférieur à 0,5 ou 0,4.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les cellules proviennent de lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour une immunoglobuline humaine de type IgG,
- 20 lesdites lignées pouvant être sélectionnées notamment parmi les lignées de myélomes de rat. par exemple YB2/0, les lignées CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.
- 25 8. Procédé de préparation selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps est un anti-facteur Rhésus(anti-D), anti-CD, anti-tumeurs, anti-virus.
9. Anticorps monoclonaux thérapeutiques ayant une forte activité ADCC, susceptibles d'être obtenus à partir des procédés selon l'une des revendications 1 à 8, lesdits

- c) sélection des anticorps dont le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur à ou égal 0,6.
4. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport taux de fucose / taux de galactose est inférieur à 0,5.
5. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le rapport entre le taux de fucose et le taux de galactose est inférieur ou égal à 0,4.
- 10 6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules de l'étape a) sont des cellules modifiées génétiquement par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s).
- 15 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les cellules proviennent de lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour une immunoglobuline humaine de type IgG, lesdites lignées pouvant être sélectionnées notamment parmi les lignées de myélomes de rat, par exemple YB2/0, les lignées CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.
- 20 8. Procédé de préparation selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps est un anti-facteur Rhésus(anti-D), anti-CD, anti-tumeurs, anti-virus.
9. Anticorps monoclonaux thérapeutiques ayant une forte activité ADCC, susceptibles d'être obtenus à partir des procédés selon l'une des revendications 1 à 8, lesdits

anticorps étant caractérisés en ce qu'ils présentent sur leur site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc, des structures glycaniques possédant un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4.

- 5 10. Anticorps monoclonaux thérapeutiques selon la revendication 9 caractérisés en ce qu'il s'agit d'IgG.
- 10 11. Anticorps monoclonaux selon les revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'IgG chimériques, humanisées ou humaines ou d'IgG ayant un fragment Fc humain.
- 15 12. Composition pharmaceutique comprenant un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 9 à 11.
- 20 13. Composition pharmaceutique comprenant au moins 50%, ou encore 90% ou 99% d'anticorps monoclonaux dans lesquels les structures glycaniques portées par le site de glycosylation (Asn 297) du fragment Fc desdits anticorps ont un rapport taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6 préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore 0,4.
- 25 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 ou 13 dans laquelle l'anticorps est dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un antigène Rhésus du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.
- 30 15. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 9 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes, notamment pour le traitement des maladies échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome

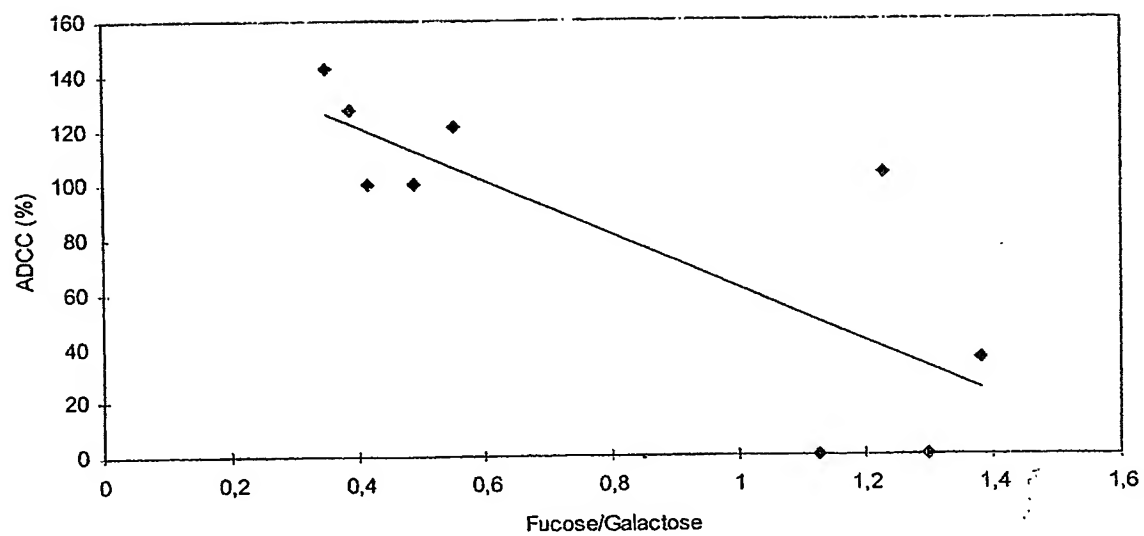
de Sézary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.

16. Utilisation selon la revendication 15 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

17. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 9 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives, les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies myéloïdes chroniques.

18. Utilisation selon la revendication 17 caractérisée en ce que l'anticorps est un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

19. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 9 à 11 pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN γ , IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections.

**FIGURE 1**